Estratto dalla *Rassegna di Bacterio-opo e Sieroterapia*
PUBBLICAZIONE MENSILE DELL'ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE
Anno III. — Fasc. 9-10 Settembre-Ottobre 1907.

MECCANISMO DI AZIONE

del

SIERO ANTICARBONCHIOSO

Immunità antiblastica (antigerminativa)

per il Dott. Prof. ALBERTO ASCOLI

Meccanismo di azione del siero anticarbonchioso: Immunità antiblastica (antigerminativa)

per il Dott. Prof. Alberto Ascoli

L'azione protettiva del siero antiantracico contro le infezioni provocate dal bacillo del carbonchio è oramai dimostrata oltre che dalle riprove cliniche anche dalle esperienze sugli animali grossi e piccoli. [1]

Generalmente per il carattere setticemico della infezione medesima per cui essa sembrerebbe imperniarsi intorno al corpo bacillare stesso si suole riferire l'immunità conferita dal siero a un'azione antibatterica del medesimo.

Senonchè il potere battericida del siero di animali (ovini, bovini, equini, cani) immunizzati contro il carbonchio nè a Sobernheim [2] nè a Sawtschenko [3] risultò per nulla superiore in vitro a quello del corrispondente siero normale.

Ottolenghi [4] invece studiando alcune proprietà del siero anticarbonchioso di asino avrebbe trovato che il siero di asini immunizzati uccide in vitro i germi introdotti non solo in maggior numero che non il siero normale ma anche con una rapidità di gran lunga superiore; ciò non pertanto egli non sa decidere « quale sia l' importanza del potere battericida in vitro del siero anticarbonchioso nella azione preventiva e curativa che questo siero ha verso l' infezione carbonchiosa »; anzi dallo studio dei malati di carbonchio e dalle osservazioni dello Sclavo [5] sulle paralisi postcarbonchiose, che deporrebbero per l'esistenza di fenomeni tossici propri di questa infezione, egli trae argomento per ammettere che nel siero anticarbonchioso vi sia, con tutta probabilità, un'azione antitossica.

Lo studio comparativo in vitro del potere battericida del siero anticarbonchioso verso ceppi di diversa virulenza a me è parso più adatto a rivelare l'eventuale rapporto tra battericidia in vitro e azione del siero in vivo, dopo che in

ricerche precedenti avevo potuto dimostrare che l'azione protettiva del siero è tanto maggiore quanto più attenuato è il germe.

Dalle esperienze relative raccolte nella tavola I, emerge senz'altro la mancanza di un parallelismo tra l'azione battericida e protettiva del siero. Senonchè le difficoltà che si oppongono ad un conteggio esatto dei germi, l' impossibilità di valutare esattamente l' influenza che la sporogenesi più o meno pronta può avere sulle cifre dedotte dal conteggio potrebbero anche togliere valore sì alle esperienze di Ottolenghi che alle mie; e un altro fattore inoltre, la moltiplicazione dei germi nel siero, contribuisce a rendere poco attendibili i risultati ottenuti col conteggio.

Però altre esperienze ancora rendono poco probabile un intervento del potere battericida, dimostrabile in vitro, nell'azione del siero anticarbonchioso in vivo. Così la mancanza di parallelismo tra potere battericida e protettivo è comprovata anche dal fatto che il siero di coniglio, fortemente battericida in vitro, non esplica alcuna azione protettiva sulla cavia in condizioni nelle quali il siero anticarbonchioso protegge invece nettamente.

Nella tavola II sono raccolti i dosaggi praticati parallelamente con siero di coniglio fortemente battericida e siero anticarbonchioso di asino con azione battericida meno spiccata: anche da questa esperienza rimane di nuovo infirmato il concetto, che a tutta prima si imporrebbe, di un nesso tra battericidia in vitro e protezione dell'animale.

La prova diretta che la sostanza protettiva è diversa dalla battericida in vitro era però riservata ad esperienze, che già comunicai al congresso di chimica in Roma[6] nelle quali — valendomi del metodo di dosaggio del siero da me elaborato per la cavia — per mezzo dell'assorbimento elettivo, dimostravo che la sostanza attiva del siero anticarbonchioso non è un ambocettore nel senso di Ehrlich e si differenzia nettamente dalle sensibilizzatrici battericide riscontrate da Ottolenghi [7] e Cler [8] nel siero anticarbonchioso, come pure da quelle del siero normale studiate da Bail. [9] L'Ottolenghi però senza ripetere le mie esperienze nè cercare di sottoporre il metodo da me usato ad una riprova sperimentale avanzò, in base ad argomenti puramente teorici, il dubbio che i miei reperti fossero dovuti ad insufficienza di assorbimento; ma una controprova fatta col mettere a contatto corpuscoli rossi col siero emolitico corrispondente dimostra come è esauriente in condizioni analoghe l'assorbimento dell'ambocettore emolitico che, per la larghezza delle ricerche su di esso istituite, si considera come il prototipo delle sensibilizzatrici.

L' impossibilità appunto di dimostrare una battericidia

specifica del siero ha fatto ricorrere ad altre ipotesi per spiegare la incontestabile sua azione contro il germe carbonchioso.

L' ipotesi che l'azione protettiva risieda in una attenuazione del germe è stata vagliata sperimentalmente dal De Nittis [10] dal Sobernheim [3] dal Sanfelice [11] dal Metschnikoff [12] dallo Sclavo [13] e da me [6]

Lo Sclavo non potè constatare alcuna attenuazione nel siero di cavallo immunizzato, trovò invece una lieve attenuazioue nel siero di asino immunizzato e nell'organismo degli animali attivamente immunizzati.

Il De Nittis invece avrebbe osservato un' attenuazione dei germi coltivati nel siero di piccione immunizzato mentre essi conservavano la loro virulenza nel siero di cavia immunizzata; introducendo i germi nel sottocutaneo constatò una attenuazione nella cavia, nessuna diminuzione di virulenza nel piccione. Sanfelice già dopo 15-20' avrebbe trovato un' attenuazione delle spore carbonchiose introdotte mediante fili di seta nel sottocutaneo di conigli passivamente immunizzati. Sobernheim per contro sostiene che il siero anticarbonchioso non si differenzia nemmeno in questo riguardo dal corrispondente siero normale ed anch'io confermavo di non aver osservato attenuazione alcuna del nostro germe vaccinale a spore nel siero anticarbonchioso di asino.

Mediante opportune esperienze mi sono convinto che il siero anticarbonchioso nemmeno in vivo è in grado di attenuare la virulenza del germe carbonchioso. In una serie di esperienze saggiai la virulenza dello stesso germe prelevandolo dal punto di innesto nella cavia protetta contro di esso: dalla tavola III in cui sono raccolti i risultati dei prelevamenti fatti alla distanza da 5 a 48 ore si rileva senz'altro che non vi è stata attenuazione del germe, nemmeno in vivo.

E' giuocoforza quindi concludere che il siero anticarbonchioso non attenua il germe nè in vitro nè in vivo.

I risultati che furono interpretati nel senso di una attenuazione nel germe in parte si possono spiegare col De Nittis come dipendente dalla qualità del siero usato, in parte saranno riferibili al numero dei germi senza ricorrere alla loro attenuazione: così praticando il trapianto di un'ansa direttamente dalla cavia protetta nella nuova (Tavola III b) il numero dei germi inoculati, che si aggira intorno ai cento (vedi Tav. VI) essendo molto inferiore alla dose minima mortale (più di 10.000 per il nostro ceppo) non è in grado di uccidere e potrebbe facilmente far ammettere una attenuazione che in realtà non esiste.

Il concetto che il siero anticarbonchioso agisca come stimolante della fagocitosi è stato avanzato già dal Marchoux [14] nei primi studi su tale siero e rispecchia le idee predominanti in quel tempo quando era in auge la teoria fagocitaria di Metschnikoff. Marchoux precisamente nel laboratorio di Metschnikoff per primo osservava nel coniglio dopo l'iniezione di siero un'eccitazione passeggiera della reazione fagocitaria che aveva per effetto la distruzione dei germi carbonchiosi.

Le conclusioni dello Sclavo [16] combinano con quelle di Marchoux in quanto che egli pure attribuisce l'azione protettiva del siero nella cavia ad un'esaltazione oltre che della battericidia degli umori, anche della fagocitosi.

Oggi, per merito specialmente delle ricerche di Wright [15] sulle opsonine e di Neufeld e Rimpau [17] sulle bacteriotropine, noi sappiamo che, nella maggioranza dei casi almeno, là dove si parlava di stimoline che dovevano agire sui leucociti, si tratta di sostanze che si fissano sui batteri, di ambocettori (Ehrlich) e fissatori (Metschnikoff, Sawtschenko) i quali renderebbero accessibili i batteri alla fagocitosi.

Ora a parte il fatto che secondo Loehlein [18] la fagocitosi del bacillus anthracis si ottiene anche coi soli leucociti lavati e che secondo Wright la fagocitosi con siero normale può essere così attiva da rendere impossibile il conteggio, dalle mie esperienze sull'assorbimento risulta che la sostanza attiva del siero anticarbonchioso non è un ambocettore o fissatore e viene tolto così ogni fondamento al tentativo di riferire l'azione del siero a bacteriopine ed opsonine, le quali vengono fissate ed assorbite dai batteri sui quali agiscono.

Di più le prove fatte studiando parallelamente in vitro il potere opsonico del siero anticarbonchioso proveniente da un asino fortemente immunizzato non rilevarono verso il nostro vaccino sporogeno un potere opsonico specifico o maggiore in confronto del siero normale. Le esperienze relative, raccolte nella tavola IV, dimostrano come, con ambedue i sieri — in armonia con quanto sostiene il Gruber — anzichè una vera fagocitosi si osserva un'azione di contatto dei leucociti sui bacilli e che, seguendo la tecnica di Wright e Hekton, non è possibile rilevare alcuna azione specifica del siero anticarbonchioso; di più che, usando leucociti non lavati, compaiono le forme animali delle quali tratterò più sotto.

Rimane pertanto la possibilità che si tratti di vere stimoline, la cui esistenza però è ancora molto discussa, le quali agirebbero direttamente sui leucociti. Per vagliare tale concetto in una serie di esperienze mi sono procurato leucociti di cavie immunizzate passivamente e di cavie normali, mettendoli in contatto parallelamente col germe vaccinale, di fronte al quale sono protette le immunizzate mentre soccombono regolarmente le cavie nuove. Ma neppure in queste ricerche, di cui rende conto la tavola V, si è potuto constatare un'azione specifica per quanto i leucociti agissero su germi sensibilizzati col siero.

Il siero anticarbonchioso presenta dunque una certa analogia con i sieri antistreptococcici che, secondo Aronson [19] e Besredka, [20] possono essere attivi senza contenere fissatori,

mentre il siero contro il mal rosso secondo Nedrigailoff [21] verrebbe ad occupare una posizione intermedia poichè, privandolo dei suoi ambocettori, diventa inattivo senza che i bacilli sensibilizzati perdano perciò la loro virulenza.

Se dunque lo studio della battericidia e della fagocitosi in vitro non riesce a svelare un'azione specifica del siero, rimane pertanto il dubbio che in vivo essa sia in grado di accrescere in qualche modo la battericidia degli umori e degli elementi cellulari.

Contro l'ipotesi che il siero anticarbonchioso in vivo agisca come battericida parlano le osservazioni di Sobernheim [2] Metschnikoff [22] e Marchoux [14] i quali constatarono la presenza, negli animali immunizzati, di germi del carbonchio fino a parecchie settimane dopo l'innesto; depone pure contro tale concetto la mancanza di una batteriolosi più spiccata sotto l'azione del siero antiantracico nei tentativi di Sobernheim onde realizzare il fenomeno di Pfeiffer per il carbonchio.

Ho creduto perciò opportuno di istituire anche in questo proposito delle ricerche che dovrebbero finalmente sfatare la leggenda che il siero antiantracico agisca da microbicida.

In una serie di esperienze, di cui rende conto la tavola VI, seguendo passo passo la scomparsa del germe vaccinale a spore nella cavia protetta, potei assodare che essa si compie lentamente, tanto che si possono trovare germi vivi al punto di innesto fino a sei giorni dopo l' inoculazione; che i germi possano resistere nell'organismo anche più a lungo è provato dal fatto che delle cavie protette ne vengono a morire fino in quindicesima giornata dopo l'innesto. All'esame microscopico (Tavola IX N. 3 e 7) localmente si osserva il medesimo quadro — minore tingibilità dei bacilli e loro degenerazione graduale con discreta fagocitosi — come lo si vede seguendo la distruzione di germi avirulenti nella cavia normale.

In un'altra serie di ricerche, che sono raccolte nella tavola VII potei poi convincermi che la distruzione del germe avirulento non è per nulla accelerata nella cavia passivamente immunizzata in confronto della cavia nuova. All'esame microscopico si osserva lo stesso quadro cioè minore tingibilità e fagocitosi (Tav. IV N. 3 e 6) sia che si introduca il germe in una cavia protetta o in una normale. La distruzione del germe avirulento come quella del germe vaccinale si compirebbe semplicemente colle forze normali dell'organismo, il quale se ne disfà lentamente allo stesso modo come si sbarazza di altri germi che non vi facciano presa: infatti il reperto che si ottiene seguendo la scomparsa di un germe similcarbonchioso non si scosta sensibilmente da quello accennato.

Escluso in tal modo che il siero antiantracico nemmeno

in vivo esplichi un'azione microbicida diretta o indiretta accelerando comunque la distruzione del germe carbonchioso, non ci rimane ormai che a vagliare l'ipotesi avanzata dal Bail, [9] dopo aver tentato indarno di inquadrarlo tra i sieri battericidi. Il Bail essendo riuscito a immunizzare fortemente tanto animali piccoli che grossi mediante il trattamento con liquido dell'edema di animali carbonchiosi ne concludeva che il siero anticarbonchioso agisce in quanto contiene una antiaggressina.

Senonchè, quantunque evidentemente le ricerche sul carbonchio formino il punto di partenza dei suoi studi sulle aggressine, il Bail non ci fornisce la prova diretta del potere aggressinico dell'edema carbonchioso.

Per poter studiare l'eventuale azione antiaggressinica era quindi necessario dimostrare la presenza delle ipotetiche aggressine del carbonchio.

Riuscito infruttuoso il tentativo di esaltare mediante l'aggressina la virulenza per la cavia di un ceppo patogeno per il topo mi sono servito per le esperienze relative di un ceppo vaccinale il quale presentava una virulenza tale che alla dose abituale di 1/4 $cm.^3$ non riusciva ad uccidere regolarmente la cavia: orbene come si rileva dalla tavola VIII l'aggiunta di liquido dell'edema non è stato in grado di esaltare la mortalità, di modo che, riuscita vana la ricerca di un aggressina, dovetti soprassedere a quella della supposta antiaggressina.

Nessuna delle ipotesi affacciate riposa dunque su basi sperimentali abbastanza solide per reggere ad una disamina serena la quale invece ci costringe ad affermare

1.) *che il meccanismo di azione del siero anticarbonchioso non rientra in nessuno degli schemi elaborati per altri sieri antagonisti.*

2.) *che la sostanza attiva in vitro non si combina coll'antigeno differenziandosi così nettamente dalla grande classe degli ambocettori o fissatori per i quali riesce facile dimostrare in vitro un'affinità specifica per i loro antigeni.*

3.) *che il siero anticarbonchioso nè in vitro e nemmeno nell'organismo accelera la distruzione del germe carbonchioso.*

Le ipotesi menzionate che tentavano appunto di spiegare l'azione del siero anticarbonchioso in base alle diverse teorie che si contendono il campo nell'interpretazione dei fenomeni dell'immunità non solo non sono riuscite a svelarci il meccanismo intimo di azione ma nemmeno a rilevare qualche proprietà specifica di tale siero.

***

Passiamo ora a quelle ricerche che furono le prime a svelarci un carattere specifico del siero e ad avviarci verso la soluzione dell'arduo problema che ci eravamo proposti.

Punto di partenza è stato lo studio metodico dei processi che si svolgono al luogo di innesto del vaccino nelle cavie passivamente protette contro di esso secondo il metodo da me proposto: come già accennavo nel comunicare il mio metodo, al punto di innesto si osserva una raccolta di leucociti i quali dopo qualche giorno si addensano in un piccolo nodulo, che microscopicamente appare costituito da un ammasso di leucociti tra i quali indarno si cercano forme vegetative del carbonchio. Nei casi in cui la protezione è insufficiente, alla periferia dei noduli si osservano chiazze emorragiche con numerosi bacilli del carbonchio, i quali sembrano aver rotta la barriera del nodulo per invadere di là l'organismo.

Ma i fenomeni specifici dovuti all'azione del siero anticarbonchioso furono messi in rilievo appena da un'osservazione metodica portata sui processi che si svolgono fin dalle prime ore al punto di innesto. Per tali ricerche è bene sostituire all' iniezione sottocutanea di coltura in brodo, l' introduzione di un'ansa di patina recente in una piccola sacca formata con un punteruolo alla spalla o all'orecchio, località preferita dal Marchoux.

Già lo Sclavo [13], in armonia colle classiche osservazioni di Babes [23] sulle capsule dei batteri patogeni, nei suoi studi sul siero anticarbonchioso aveva osservato che, se si iniettano sotto cute alle cavie i germi del primo vaccino, dopo 6 o 7 ore circa accanto a una debole fagocitosi e distruzione dei bacilli si trovano forme più grandi circondate di una capsula, la quale si tinge leggermente in violaceo con bleu di metilene, mentre il bacillo si colora in azzurro cupo.

Tali forme dal Deutsch [24], che esso pure ne segnalava la comparsa nel peritoneo, dopo un periodo di latenza dei germi, furono chiamate seconda generazione mentre recentemente il Gruber [25] le ribattezzava col nome di bacilli capsulati. Lo Sclavo ed il Gruber sono concordi nell'ammettere che la capsula rappresenti un apparecchio di difesa del microorganismo, il Bail [26] ritiene che si tratti di una modificazione morfologica che il germe presenta nel corpo animale.

Se non che forme analoghe si osservano coltivando semplicemente il carbonchio in siero di sangue. Il bacillo del carbonchio che negli ordinari terreni di nutrizione si presenta sotto forma di bastoncini e filamenti sottili, i quali col bleu

di metilene presentano una tinta azzurra (Tav. IX N. 1), coltivato in siero si fa più tozzo e col bleu di metilene assume una colorazione violetta del corpo circondato da un'alone roseo (Tav. IX N. 2).

In tali caratteri io ravviso dunque l'espressione dell'attecchimento del germe sullo speciale terreno offertogli e la reazione metacromatica descritta per me è indizio che il microorganismo è in grado di germogliarvi.

Dal complesso delle ricerche rivolte a studiare questo particolare processo di germinazione in vivo sono emersi alcuni fatti atti a chiarire sia il concetto di virulenza del carbonchio come l'azione specifica del siero anticarbonchioso.

Se alla cavia nuova si iniettano ceppi virulenti o attenuati vaccinali (capaci di uccidere la cavia ma non il coniglio) le forme germinative compaiono già dopo circa 5 ore, mentre invece il ceppo avirulento non subisce tale evoluzione o presenta soltanto poche forme germinative isolate. Tale parallismo che io rilevavo l'anno scorso nella mia comunicazione [27] al congresso dei patologi italiani, in seguito è stato notato anche dal Gruber [25] e dal Preisz [27], i quali vennero in tal modo a conermare i miei reperti.

Nella tavola IX sono riprodotti appunto i tre quadri tipici quali si osservano dopo l'introduzione dei tre ceppi uno virulento l' altro vaccinale il terzo avirulento nella cavia nuova.

Il ceppo virulento (N. 5) dà luogo alla comparsa rapida di numerose forme germinative mentre sono pochi i bacilli colturali con una tinta debole ed è scarsa anche la fagocitosi.

Col ceppo vaccinale (N. 4) i germogli sono pure numerosi, ma sono anche meno scarsi i bacilli colturali in sfacelo o fagocitati.

Il ceppo avirulento (N. 3) invece nella cavia non presenta forme germinative o soltanto qualche esemplare isolato mentre invece sono numerosi i bacilli degenerati e fagocitati.

Vediamo ora come si comportano le cavie validamente protette secondo il mio metodo.

L' innesto del ceppo attenuato (N. 7) in esse non è seguito dalla comparsa delle forme violette con guaina rosea, i bacilli conservano invece il loro aspetto culturale assumendo gradatamente meno bene i colori di anilina e presentando una discreta fagocitosi.

Il quadro che si osserva nella cavia validamente protetta ricorda sensibilmente quello che abbiamo rilevato per il germe avirulento nella cavia normale. Infatti la cavia immunizzata resiste, entro il limite d'errori inerenti al mio metodo, al ceppo vaccinale, così che la inibita comparsa delle forme

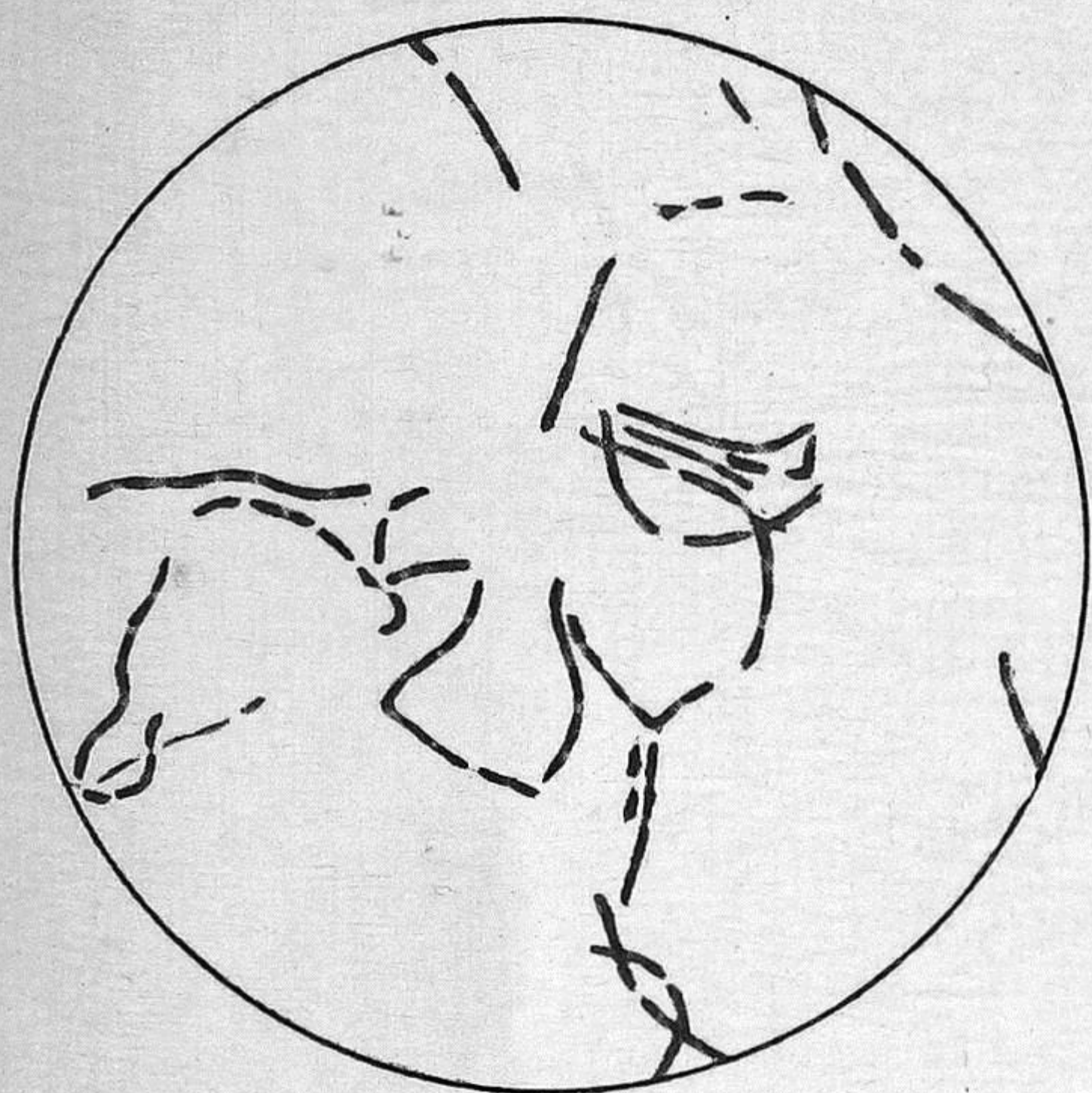
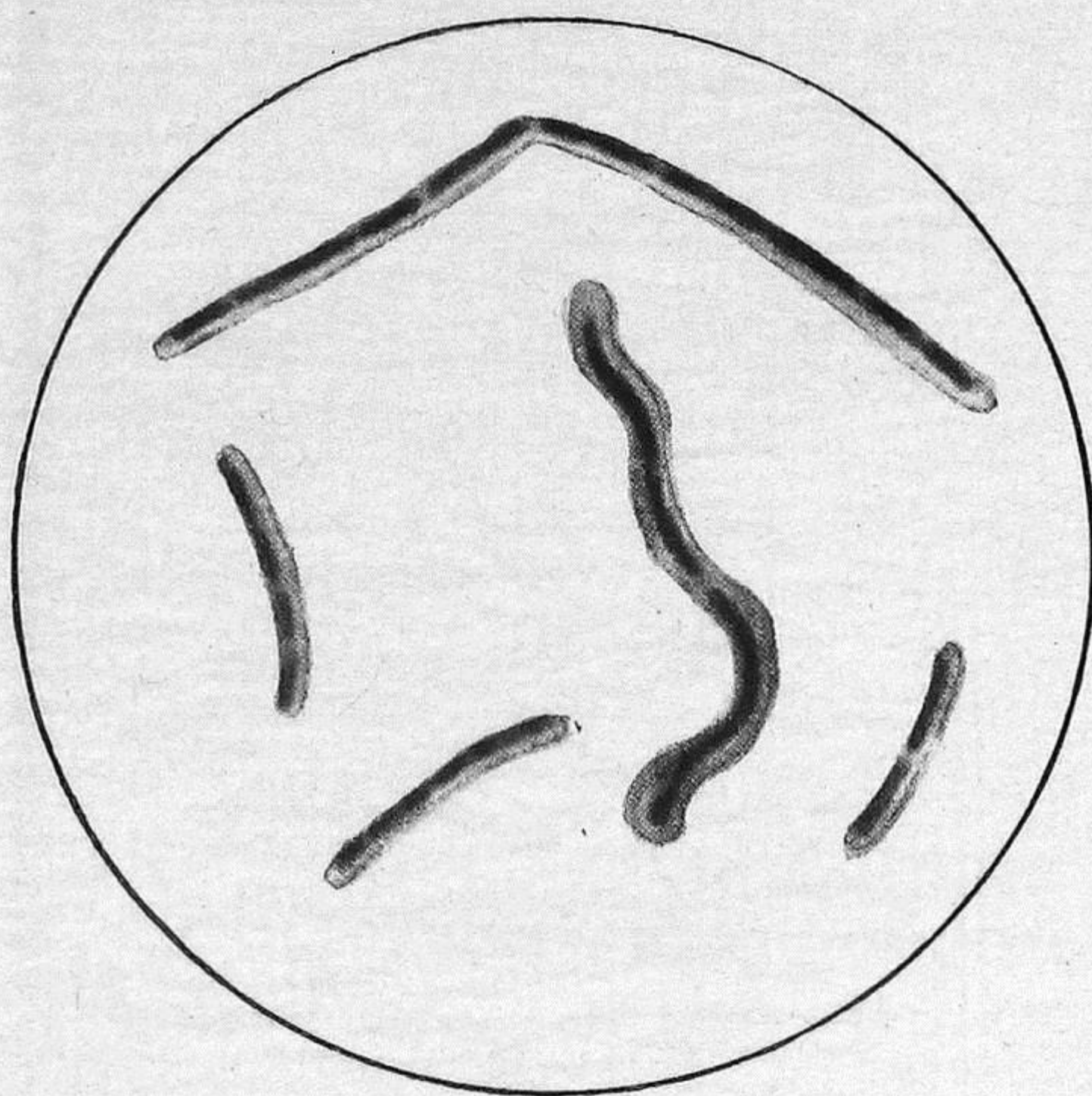
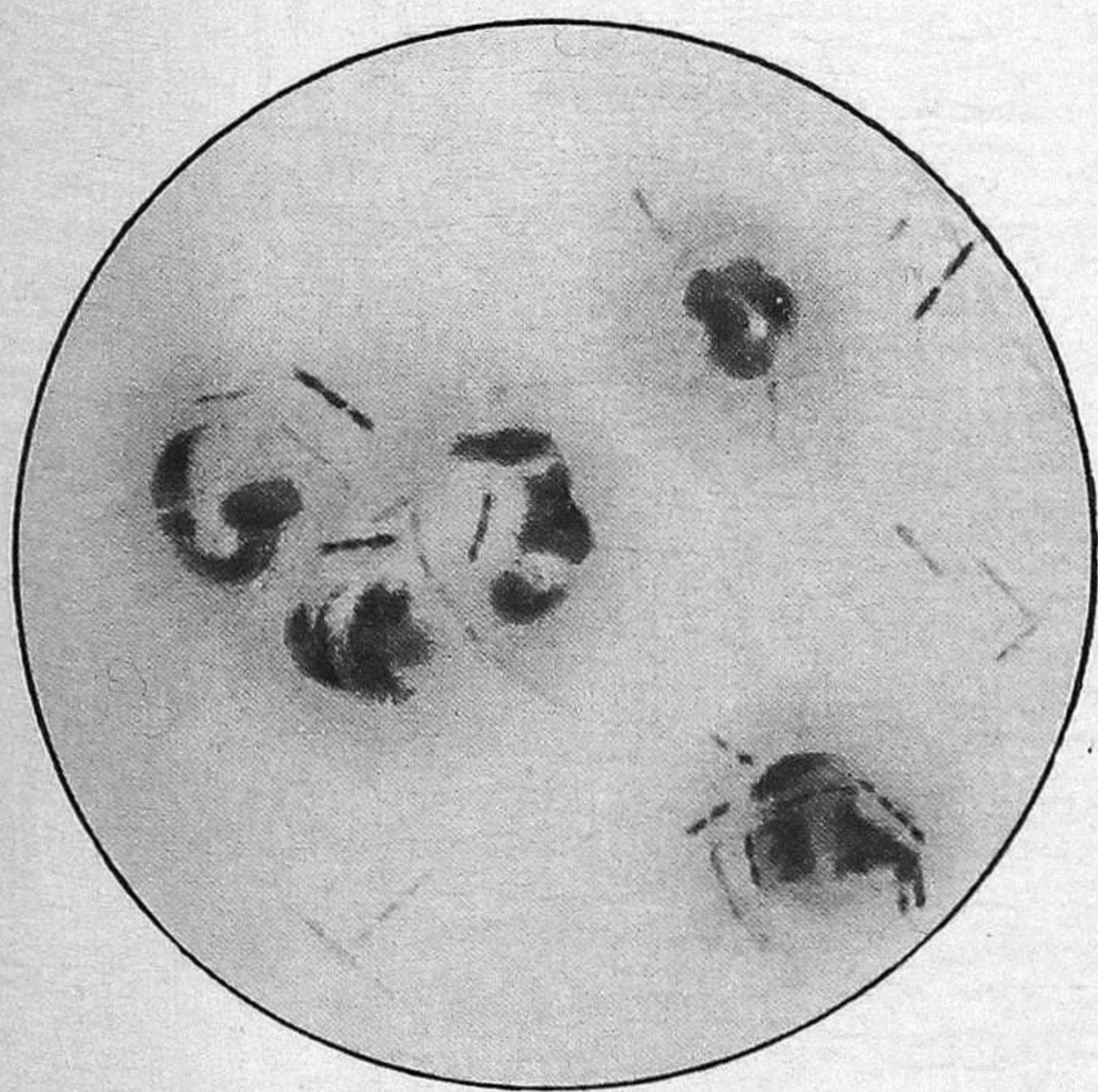
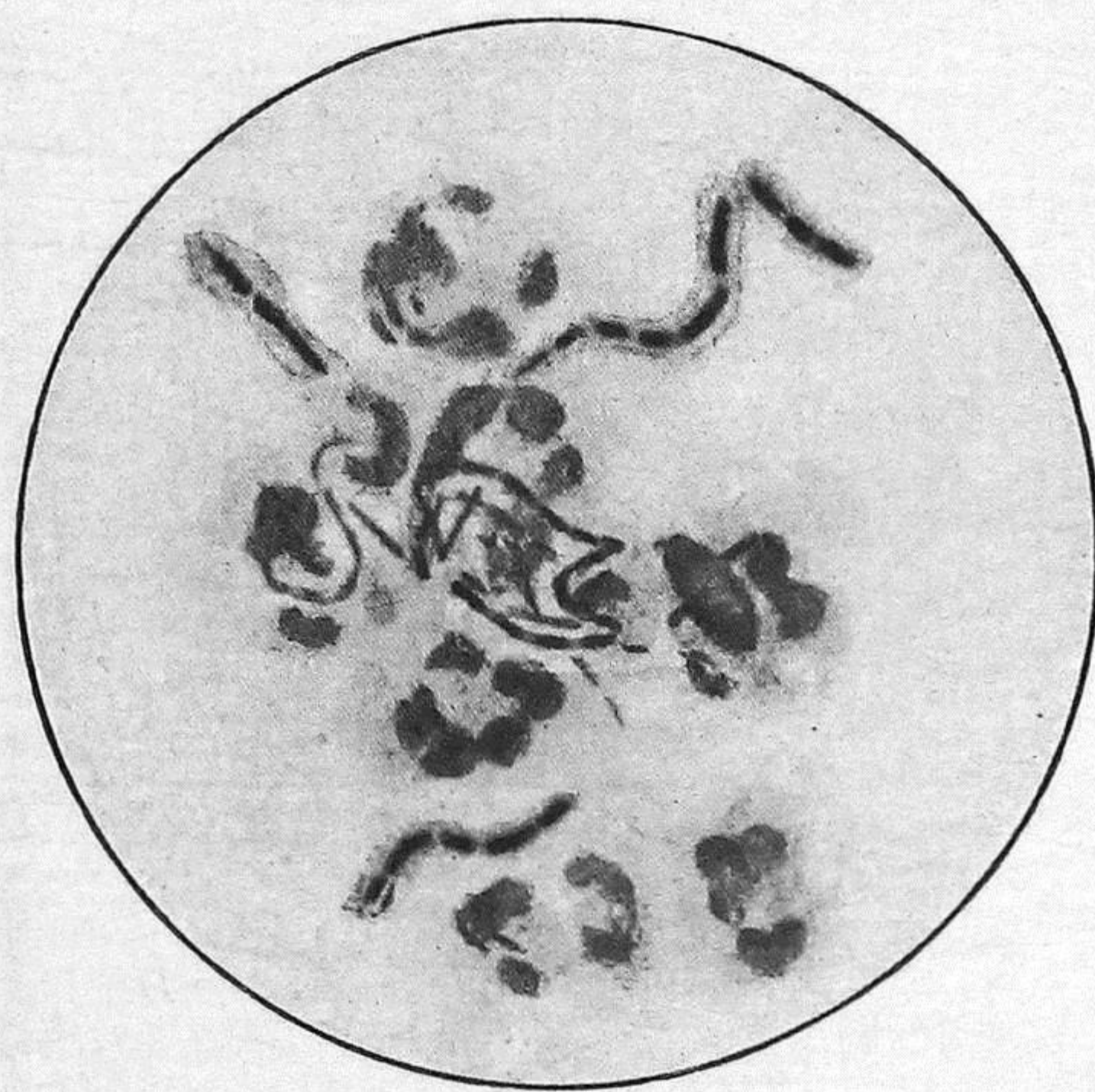
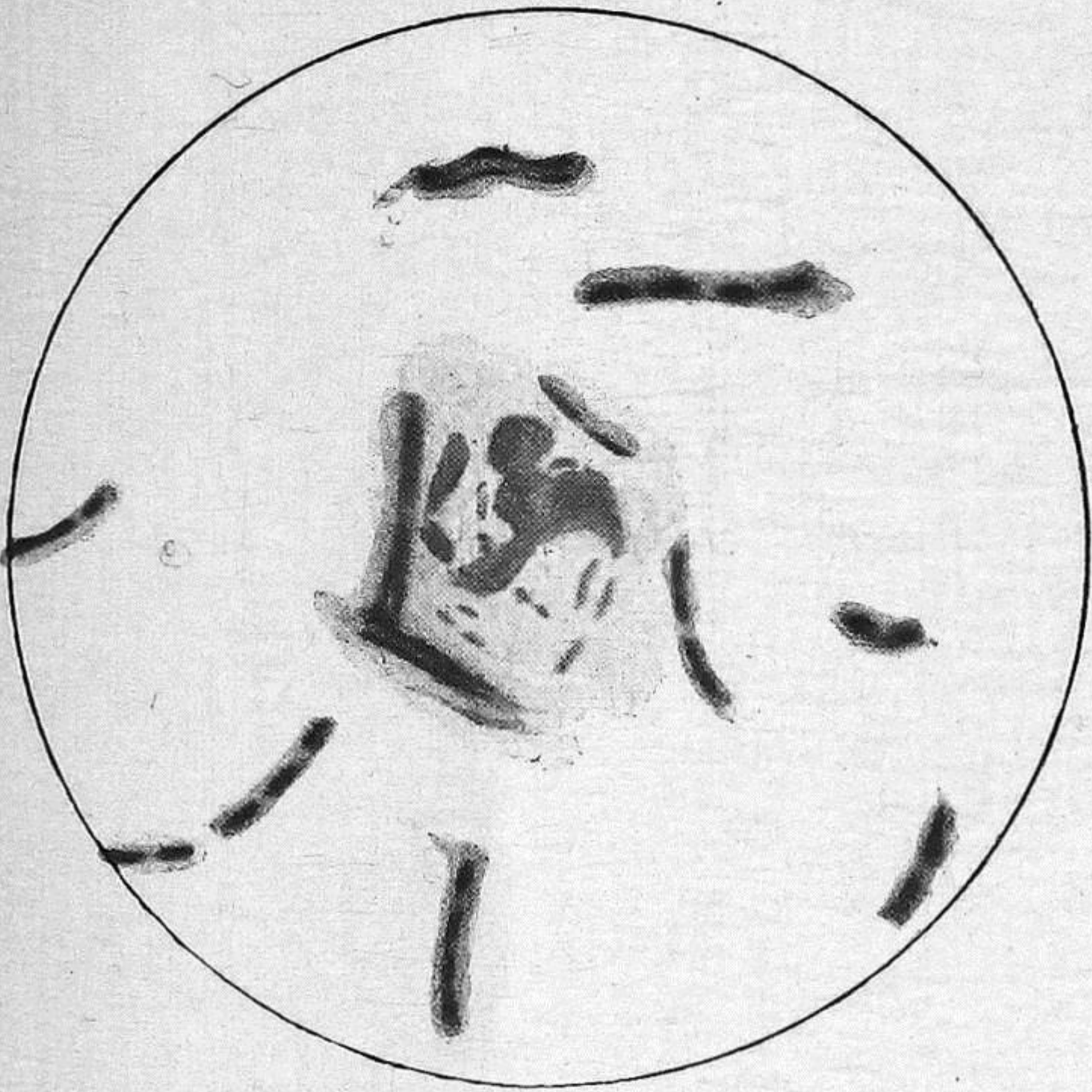
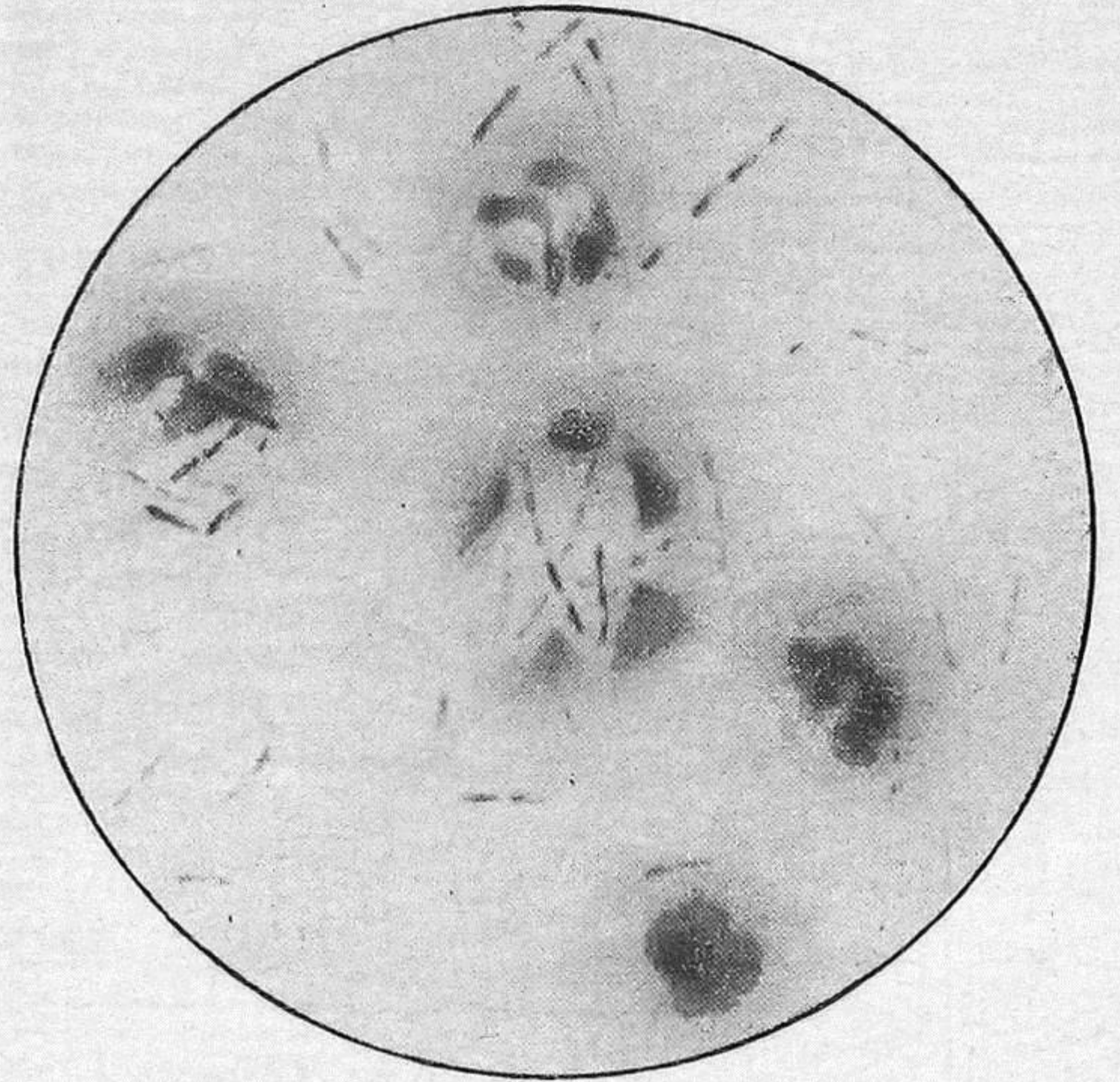
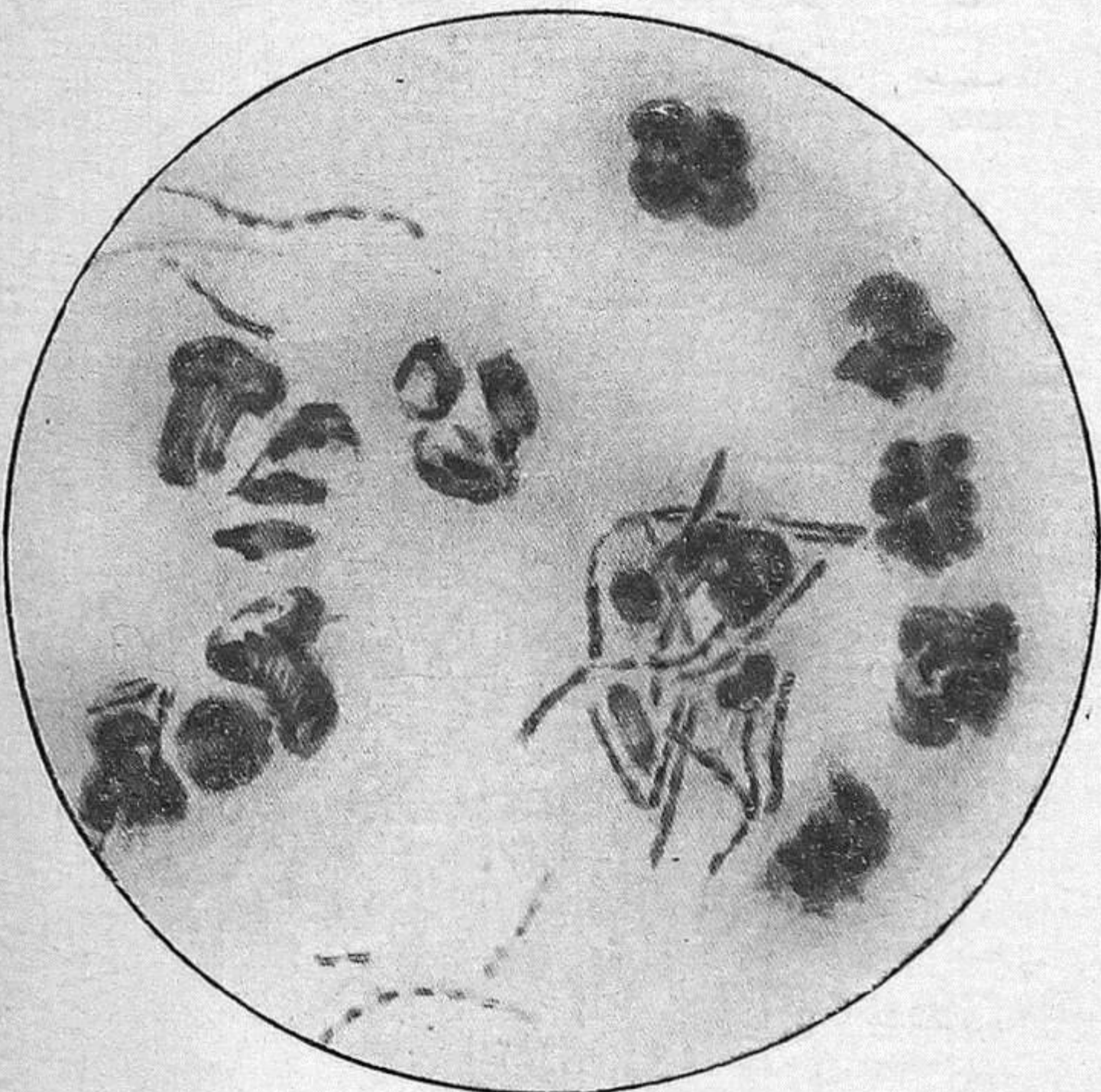
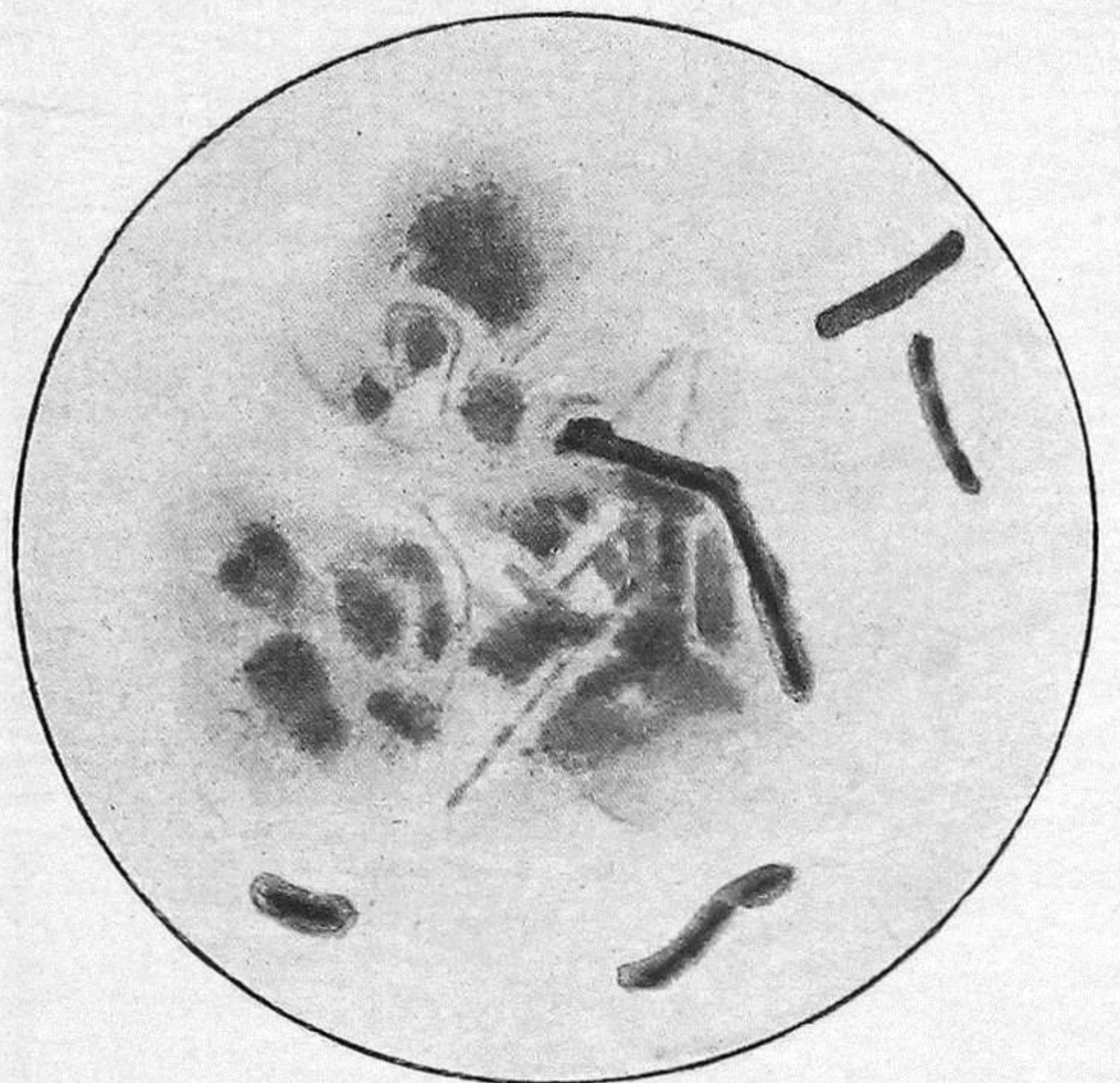
TAVOLA IX.

N. 1

N. 2

N. 3

N. 4

TAVOLA IX.

N. 5

N. 6

N. 7

N. 8

germinative rappresenta l'indice morfologico di una azione specifica del siero anticarbonchioso.

Di fronte al ceppo virulento (N. 8) come non è possibile la protezione della cavia col mio metodo, così pure è vana l'azione inibitrice conferita dal siero; le forme germinative non tardano a comparire e l'organismo soccombe col solito reperto. In modo analogo si comporta la cavia non sufficientemente protetta.

Il fatto più saliente e costante è appunto il parallelismo tra protezione dell'animale e l'ostacolata germinazione del bacillo.

La fagocitosi e i processi degenerativi dei bacilli rappresenterebbero dei fatti secondari che si verificano regolarmente quando è mancato l'attecchimento dei germi.

Rimane dunque assodato che il siero anticarbonchioso protegge la cavia in quanto che inibisce quell'evoluzione del germe alla quale è legato il suo attecchimento: considerata la cavia protetta come terreno nutrizio per il germe vaccinale, il substrato sembrerebbe modificato in modo che i processi biochimici inerenti all'attecchimento, i quali per ora ci vengono svelati da un semplice indizio morfologico, non possono svolgersi; in altre parole *il siero anticarbonchioso agirebbe da antagonista specifico della reazione evolutiva del germe nel substrato offertogli.*

La produzione del fenomeno in vitro, che ne renderebbe più agevole lo studio, finora non è stata possibile nè col siero nè col plasma. Ciò starebbe ad indicare che il siero appena nell'organismo trova le condizioni necessarie alla sua attivazione: infatti questa ha luogo non appena il siero viene introdotto nel sottocutaneo.

I dati sperimentali esposti ci costringono pertanto ad abbandonare l'antico concetto battericida e a sostituirvi quello di una *immunità antiblastica* (βλάστη = germinazione, germoglio) o *antigerminativa* quale esponente del meccanismo di azione del siero anticarbonchioso in vivo.

TAVOLA I.

Emulsiono un'ansa di diversi ceppi avirulenti, vaccinali e virulenti in 5 cm^3 di siero fresco proveniente da un asino fortemente immunizzato.

Dopo uno risp. tre giorni di soggiorno in termostato pratico il conteggio facendo delle piastre con 0,1 cm^3 di tale emulsione.

Avirulento = non uccide la cavia.

Vaccinale = uccide la cavia ma non il coniglio.

Virulento = uccide cavia e coniglio.

Ceppo usato	Virulenza	Conteggio dopo 1 giorno	Conteggio dopo 3 giorni
Past. I.	avirulento	28.000	30.000
Past. II	avirulento	200	500
Cienk.	avirulento	70	2
Merck	avirulento	10	3
Deutsch I	vaccinale	40.000	43.000
Deutsch II	vaccinale	200	750
Vaccino nostro	vaccinale	400	300
Carbonchio A	vaccinale	1200	1000
Carbonchio B.	virulento	1000	700
Carbonchio Boll.	»	1500	40.000
Carbonchio Ger.	»	30	20
Carbonchio Gabr.	»	100.000	100.000
Carbonchio Galb.	»	25.000	50.000
Carbonchio Germ.	»	16.000	50.000
Carbonchio Isol.	»	25.000	40.000
Carbonchio Mand.	»	25.000	35.000
Carbonchio Mal.	»	12.000	1.200
Carbonchio Secco	»	59.000	60.000

TAVOLA II.

Potere protettivo del siero di coniglio saggiato col mio metodo di fronte al vaccino nostro e al vaccino Pasteur I° in confronto del siero anticarbonchioso di asino.

Sieru di coniglio	Ceppo	Esito	Reperto
4 cm^3	Vaccino nostro	+ 5 giorni	Carbonchio
3 cm^3	»	+ 3 giorui	»
2 cm^3	»	+ 3 giorni	»
2 cm^3	Vaccino Pasteur I.	+ 2 1/2 giorni	»

Siero di asino immunizz.	Ceppo	Esito	Reperto
4 cm.^{3}	Vaccino nostro	vive	Carbonchio
3 cm.^{4}	»	vive	»
2 cm.^{3}	»	vive	»
2 cm.^{3}	Vaccino Pasteur I	vive	»
controllo	Vaccino nostro	+ 2 1/2 giorni	»
controllo	Vabcino Pasteur I.	+ 3 giorni	»

TAVOLA III.

a) Inoculazione nella cavia di colture ottenute seminando in brodo il germe isolato dal punto d'innesto nelle cavie protette.

Il germe fu isolato	La cavla inoculata colla dose vaccinale	Reperto
5 ore dopo l'innesto	+ 2 1/2 giorni	Carbonchio
Id.	+ 3 1/3 »	»
Id.	+ 3 1/2 »	»
24 ore dopo l'innesto	+ 1 1/2 giorno	»
Id.	+ 1 1/2 »	»

b) Trapianto di un'ansa, prelevata dal punto d'innesto del ceppo vaccinale nella cavia protetta, in una cavia nuova.

Il prelevamento fu fatto	La cavia inoculata	Reperto
5 ore dopo l'innesto	+ 2 1/2 giorni	Carbonchio
Id.	vive	—
27 ore dopo l'innesto	»	—
Id.	»	—
Id.	»	—
Id.	»	—
48 ore dopo l'innesto	»	—
Id.	»	—
Id.	»	—
Id.	»	—

TAVOLA IV.

Le esperienze furono eseguite facendo agire leucociti lavati e non lavati di cavia sul nostro vaccino sensibilizzato parallelamente con siero normale e anticarbonchioso di asino, seguendo la tecnica di Wright e Hekton.

a) leucociti lavati.

Osservazioni fatte	Siero normale di asino	Siero anticarbonchioso di asino
Dopo 5'	Bacilli e leucociti isolati	Bacilli e leucociti isolati
» 30'	Lieve accumulo di leucociti intorno ai bacilli (Kontaktwirkung).	Leggero accumulo di leucociti intorno ai bacilli (Kontaktwirkung.
» 8 ore	accumulo maggiore	accumulo maggiore
» 24 ore	accumulo come sopra i bacilli sono sbiaditi	accumulo come sopra i bacilli sono sbiaditi

b) leucociti non lavati.

Osservazioni fatte	Siero normale di asino	Siero anticarbonchioso di asino
Dopo 5'	Kontaktwirkung	Kontaktwirkung
» 30'	Id. e bacilli sbiaditi	Id. e bacilli sbiaditi
» 13 ore	accanto al reperto descritto parecchie forme germinative	accanto al reperto descritto parecchie forme germinative

TAVOLA V.

Le esperienze furono eseguite facendo agire: *a*) leucociti di cavie normali *b*) leucociti di cavie protette secondo il mio metodo, sul nostro vaccino sensibilizzato con siero anticarbonchioso di asino, seguendo la tecnica di Wright e Hekton.

Osservazioni	Leucociti di cavie normali	Leucociti di cavie protette
Dopo 15'	Kontaktwirkung	Kontaktwirkung
Dopo 1 ora	idem	idem
Dopo 24 ore	idem i bacilli sono sbiaditi	idem i bacilli sono sbiaditi

TAVOLA VI.

La distruzione fu seguita prelevando a epoche diverse un'ansa dalla saccoccia in cui era stato fatto l'innesto del germe e praticando il conteggio controllato dall'esame microscopico di una seconda ansa.

Cavia	Prelievo	Conteggio	Esame microscopico
1088	dopo 5 ore (dall'orecchio)	circa 100 colonie su agar; in brodo cresce debolmente	Bacilli colturali sbiaditi in parte circondati da cumuli leucocitari. Assenza di forme germinative
1089	idem	circa 100 colonie su agar	idem
1090	idem	circa 100 colonie su agar in brodo cresce meglio che il 1088	idem c'è però qualche forma ben conservata con una tinta tendente al violetto
1091	idem	circa 25 colonie su agar; in brodo cresce meno del 1088	come il 1088
1092	dopo 24 ore	Agar sterile il brodo presenta un piccolo fiocchettino di carbonchio	bacilli quasi completamente scoloriti in parte circondati da cumuli di leucociti
1094	idem	Una sola colonia	idem v'è però qualche filamento discretamente colorato
1096	dopo 3 giorai dalla spalla	Qualche colonia	—
1097	dopo 6 giorni	8 colonie	—

TAVOLA VII.

La distruzione fu seguita come nella tavola precedente dopo aver introdotto parallelamente nelle cavie protette e in quelle nuove un'ansa di patina su agar del germe avirulento, nelle saccoccie formate all'orecchio o alla spalla.

Le cifre segnate sono la media dei numeri ottenuti su una serie di sei cavie.

Epoca del conteggio	*a)* cavie nuove	*b)* cavie protette
24 ore dopo l' innesto	697	1461
55 ore dopo l' innesto	1088	617
dopo 3 giorni	375	366
dopo 6 1/2 giorni	63	34
dopo 11 1/2 giorni	parecchie	parecchie

TAVOLA VIII.

L'esperienza fu eseguita iniettando parallelamente a cavie il ceppo con e senza aggressina.

a) senza aggressina.

Peso della cavia	Quantità dei germi	Esito	Reperto
gr. 450	0,25 di coltura in brodo	+	Carbonchio
» 250	»	+	»
» 250	»	+	»
» 150	»	vive	—
» 350	»	»	—
» 350	»	»	—
» 350	»	+	carbonchio
» 320	»	+	id.
» 350	»	+	id.
» 350	»	+	id.
» 300	1 cm. di coltura in brodo	+	id.

b) con aggressina.

Peso della cavia	Quantità di coltura in brodo	Aggressina	Esito	Reperto
gr. 320	1/10 di agar	2 cm.^{3}	+	carbonchio
» 280	idem	idem	vive	—
» 340	0,25 di coltura in brodo	1 cm.	+	carbonchio
» 350	idem	»	vive	—
» 340	»	»	+	carbonchio
» 340	»	»	vive	—
» 340	»	»	+	carbonchio
» 300		»	vive	—